

Aus der Medizinischen Forschung des Haupt-
laboratoriums der Schering AG, Berlin
Direktor: Professor Dr. med Martin Kramer

Experimentelle Untersuchungen über
den Einfluss von Glycodiazin auf die
insulin-like-activity

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ekkehard Petzold
aus Dresden

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Forschung des Haupt-
laboratoriums der Schering AG, Berlin
Direktor: Professor Dr. med Martin Kramer

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Glycodiazin auf die insulin-like-activity



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ekkehard Petzold
aus Dresden

Dekan: Professor Dr. med. Hans-Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr. med. Martin K r a m e r
Korreferent: Professor Dr. med. Helmut C o p e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28.11.1967

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. Glycodiazin - seine blutzuckersenkende Wirkung, sein Einfluss auf das Pankreas und die Möglichkeiten des Wirkungsnachweises.	1
II. Methode zum quantitativen Insulinnachweis mittels 1- ¹⁴ C-Glucose und des epididymalen Fettanhangs.	
1. Verwandtes Tiermaterial für die Gewinnung des epididymalen Fettgewebes und Versuchsdurchführung.	4
2. Puffer, die zur Verwendung gelangten Insulinkonzentrationen und die Aktivität der markierten Glucose.	4
3. Gewinnung des Nebenhodenfettgewebes.	6
4. Untersuchungen über die mögliche Schwankungsbreite des Gewichtes des epididymalen Fettanhangs in Bezug auf die Genauigkeit des Messergebnisses.	6
5. Gewinnung und Messung des C ¹⁴ O ₂ .	8
6. Koordinatensystem zur Ermittlung der insulin-like-activity.	11

7. Verwandtes Tiermaterial zur quantitativen Insulinbestimmung 12
8. Chemische Eigenschaften des Glycodiazins. 13

III. Ergebnisse

1. Eichkurve

- a. Aufstellung und Fehlerberechnung der Eichkurve. Streuungsbreite der Radioaktivitätsimpulse bei unterschiedlichen Insulinaktivitäten. 14
- b. Das Verhalten des Anstieges der Eichkurve und der Streuungsbreite der Radioaktivitätsimpulse bei einer Änderung der Aktivitätskonzentration der 1-¹⁴C-Glucose. 19

2. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucose-spiegel und ILA an Ratten nach Gabe von Glycodiazin per os in der Dosis 100 mg/kg Körpergewicht. 27

3. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucose-spiegel und ILA an Hunden nach Gabe von Glycodiazin per os in der Dosis von 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht. 34

4. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucose- spiegel und ILA an Hunden nach Gabe von Glycodiazin intravenös in der Dosis von 50 mg/kg, 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.	40
5. Der Einfluss wiederholter Blutent- nahmen auf Glucose und ILA bei einem unbehandelten Hund.	46
IV. Diskussion	48
V. Zusammenfassung	53
VI. Literaturverzeichnis	54

I. Glycodiazin - seine blutzuckersenkende Wirkung, sein
Einfluss auf das Pankreas und die Möglichkeiten des
Wirkungsnachweises.

Über die Pharmakologie einer blutzuckersenkenden Verbindung aus einer chemisch neuartigen Gruppe, nämlich 2-Sulfonamido-5-alkoxypyrimidine berichteten KRAMER et al.(14,15). Aus dieser Reihe erwies sich das 2-Benzol-sulfonamido-5-methoxy-äthoxy-pyrimidin (Glycodiazin) als besonders wirksam und verträglich.

Nach Versuchen an alloxandibetischen Ratten und Hunden sowie nach Beobachtungen am pankreaslosen Hund ist die Wirkung des Glycodiazins an das Vorhandensein intakter Langerhans'scher Inseln gebunden. Bei Ratten trat nach akuter oder mehrwöchiger Behandlung mit Glycodiazin eine Degranulierung der Beta-Zellen auf. Beim Hund wurden nach einjähriger Behandlung gleichfalls degranulierte Beta-Zellen gefunden. Ferner wurde eine Inselneubildung beobachtet. Diese beschriebene Wirkung des Glycodiazins auf Blutzucker und Pankreas ist der Anlaß zum folgenden Beitrag über den Einfluß von Glycodiazin auf die Insulinausschüttung im Tierversuch.

Zur Bestimmung über Ausmaß und Ablauf der Insulinausschüttung werden mehrere Methoden verwandt. Diese Methoden bestehen im Prinzip alle auf dem Vergleich bestimmter biologischer Wirkungen von Serum und Plasma mit den entsprechenden Wir-

kungen kristallinen Insulins.

Bei den biologischen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Insulin wird entweder der hypoglykämische Effekt am Ganztier oder die direkte Wirkung von Insulin auf ein isoliertes Organ abgelesen.

BORNSTEIN hat eine Bestimmungsmethode an ADHA - Ratten (adrenalektomierte, hypophysektomierte und alloxandiabetische Ratten) veröffentlicht (5). Neben dem erheblichen operativen Aufwand ist diese Methode mit dem Nachteil einer großen Streubreite behaftet.

VALLANCE - OVEN und HURLOCK sowie WEIGHT untersuchten die Insulinwirkung mittels der Glucoseaufnahme am Rattenzwerchfell, weil Untersuchungen am isolierten Organ einfacher durchführbar sind (21). Diese Methode ist auch für viele Fragestellungen genügend empfindlich.

1958 haben MARTIN und RENOLD eine sehr empfindliche Methode eingeführt, die vom isolierten epididymalen Fettgewebe der Ratte ausgeht (17,18,19). Bei dieser Methode wird die Wirkung kleinster Insulinaktivitäten auf den Kohlehydratstoffwechsel des isolierten Nebenhodenfettgewebes der Ratte unter Verwendung von radioaktiv markierter Glucose untersucht.

YALOW und BERTSON entwickelten eine immunologische Bestimmungsmethode, bei der ein immunologisch mit Insulin identisches Polypeptid bestimmt wird (22,23,24).

In meiner Arbeit verwandte ich zum quantitativen Insulin-
nachweis die Methode, bei der 1-C¹⁴-Glucose zu C¹⁴O₂ am
epididymalen Fettgewebe der Ratte oxydiert wird.

Mittels dieser sogenannten Rattenfettgewebsmethode unter-
suchte ich an Ratte und Hund den Funktionsablauf der
Insulinausschüttung in Zeit und Dosisabhängigkeit der Glyco-
diazinverabreichung.

II. Methode zum quantitativen Insulinnachweis mittels $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose und des epididymalen Fettanhangs.

1. Verwandtes Tiermaterial für die Gewinnung des epi- didymalen Fettgewebes und Versuchsdurchführung.

Die Tiere, von denen das Fettgewebe gewonnen wurde, waren weiße Ratten eines in Inzucht gezüchteten Wistar-Stammes mit einem Körpergewicht von 200 - 260 g. Sie wurden bis zu Versuchsbeginn unter gleichartigen Bedingungen einzeln gehalten und mit einem Standardfutter ernährt. Trinkwasser wurde ad libitum gereicht. Sie wurden durch Nackenschlag getötet und durch Eröffnung der Carotiden entblutet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle konnte dann der epididymale Fettanhang am Hoden entnommen werden. Von dem Nebenhodenfettgewebe wurden etwa 200 mg schwere Teile abgeschnitten und in einem Puffer bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Der Puffer in den Inkubationsgefäßen, der das zu untersuchende Serum oder die zur Eichung definierte Menge kristallinen Insulins enthielt, war auf 250 mg% Glucose eingestellt. Ein geringer Teil dieser Glucose war mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose etikettiert. Nach Begasung mit Oxycarbon wurde das gebildete C^{14}O_2 in NaOH aufgefangen, zur Messung gebracht und berechnet.

2. Puffer, die zur Verwendung gelangten Insulinkonzentrationen und die Aktivität der markierten Glucose.

Ich verwandte einen Krebs-Bicarbonatpuffer mit folgender Zusammensetzung:

4 ml 0,154 m KCl
3 ml 0,110 m $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
1 ml 0,154 m MgSO_4
1 ml 0,154 m KH_2PO_4
21 ml 0,154 m NaHCO_3
100 ml 0,154 m NaCl

Außer den genannten 250 mg % Glucose enthielten je 100 ml Puffer 200 mg im Wasserbad bei 38°C gelöste Gelatine.

Um aus den unbekannten Seren quantitativ die Insulinmenge bestimmen zu können, stellte ich Verdünnungsreihen mit folgenden Konzentrationen her: 1000 mikro E; 750 mikro E; 500 mikro E; 375 mikro E; 250 mikro E; 125 mikro E; 62,5 mikro E; 31,25 mikro E. Zu je 1,9 ml Puffer wurde 0,1 ml inaktiv verschnittene $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose (Hersteller: Radioactive Centre Amersham, England) mit einer spezifischen Aktivität von 2,6 mikro Ci / mMol hinzugegeben. RENOLD setzte bei seinen Versuchen etikettierte Glucose mit einer Radioaktivität von 0,4 mikro Ci ein (17). Da die Radioaktivitätsbestimmung in meinen Proben mit einer sehr empfindlichen Meßtechnik durchgeführt wurde, kam ich mit einer Radioaktivität von 0,08 mikro Ci aus.

Diesem Puffer wurde das zu untersuchende Serum mit einem bekannten Glucosegehalt zugesetzt.

3. Gewinnung des Nebenhodenfettgewebes.

Das zu inkubierende Fettgewebe der Nebenhoden wurde derart gewonnen, daß die Testes mit einer Pinzette intra abdominal verlagert wurden und das Fettgewebe unter Schonung der A. spermatica sorgfältigst abpräpariert wurde. Mit einer Schere wurde das Fettgewebe in einen proximalen, zwei medialen und einen distalen Teil unterteilt. In Vorversuchen wurde, um eine Traumatisierung des Fettgewebes zu verringern, das epididymale Fett auf einer Stearinunterlage, die mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt war, mit einem Skalpell unterteilt. Diese technisch aufwendige Methode erbrachte aber gegenüber dem Scherenschnitt keine Vorzüge. Nach DITSCHUNEIT soll das Feuchtgewicht der Fettzipfel zwischen 80 und 200 mg (8), nach RENOLD zwischen 70 und 170 mg liegen (18).

4. Untersuchungen über die mögliche Schwankungsbreite des Gewichtes des epididymalen Fettanhangs in Bezug auf die Genauigkeit des Meßergebnisses.

Bei meinen 719 Untersuchungen hatte das epididymale Fettgewebe in 546 Fällen ein Gewicht zwischen 70 und 170 mg. Bei 173 Untersuchungen lag das Fettgewicht mit 170 - 320 mg oberhalb bzw. mit 10 - 70 mg unterhalb dieser Grenze. Die Fettgewebsgewichte sind in Beziehung zum Mittelwert der gefundenen Insulinkonzentrationen in der Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Fettgewichtsklasse Häufigkeit der Werte in den einzelnen Fettgewichtsklassen und ihr Verhältniss zum Mittelwert der gefundenen Insulinkonzentration.

	weit über dem Mittelwert	im Bereich des Mittelwertes	weit unter dem Mittelwert
0 mg -- 10 mg	-	-	-
10 mg -- 20 mg	-	2	-
20 mg -- 30 mg	1	3 (1)	-
30 mg -- 40 mg	1	2 (1)	1
40 mg -- 50 mg	1	4	1
50 mg -- 60 mg	1 (1)	12	1
60 mg -- 70 mg	-	13	2
170 mg -- 180 mg	2	19 (4)	2
180 mg -- 190 mg	1	13	4
190 mg -- 200 mg	4	19	-
200 mg -- 210 mg	-	12 (1)	1
210 mg -- 220 mg	-	8	-
220 mg -- 230 mg	-	8 (2)	-
230 mg -- 240 mg	1	7 (1)	1
240 mg -- 250 mg	-	3	-
250 mg -- 260 mg	-	1 (1)	-
260 mg -- 270 mg	-	5	1
270 mg -- 280 mg	-	1	-
280 mg -- 290 mg	-	-	-
290 mg -- 300 mg	-	-	-
300 mg -- 310 mg	-	-	-
310 mg -- 320 mg	-	1	-

Die Klassifizierung geschah derart, daß von den acht eingesetzten Fettgeweben einer Insulinkonzentration der Mittelwert gebildet wurde.

War die Aktivität des Fettgewebes über bzw. unter dem Mittelwert, wurde sie in die Rubrik "weit über dem Mittelwert" bzw. "weit unter dem Mittelwert" eingeordnet. Bei den in Klammern wiedergegebenen Werten handelt es sich um solche, deren Tendenz zu der jeweiligen Klasse ging.

Insulinbestimmungen mit einem Nebenhodenfettgewicht außerhalb der von RENOLD angegebenen Gewichtsgrenzen ergaben nur in 13 Fällen höhere und in 14 Fällen niedrigere Ergebnisse als die Norm. 146 Messungen erbrachten denselben Mittelwert wie Untersuchungen mit einem Fettgewicht von 70 - 170 mg.

Die strenge Einhaltung der von RENOLD angegebenen Gewichtsgrenzen ist demnach nicht erforderlich. Bei zu kleinen Gewebsschnitten besteht jedoch m.E. die Gefahr einer Traumatisierung bei der Segmentherstellung, bei zu großen Fettgewebsteilen sind Diffusionsschwierigkeiten denkbar.

5. Gewinnung und Messung des $C^{14}O_2$.

Die Fettgewebssegmente wurden in Inkubationsfläschchen eingegeben. Die Gefäße wurden mit einer Gummihülle verschlossen (siehe Abb. 1). An der Unterseite des Gummistopfens war eine Metallöse mit Klammer befestigt, in der ein Kunststoffnäpfchen fixiert war. Um schon gebildetes CO_2 auszutreiben, wurde das

Inkubationsfläschchen drei Minuten mit Oxycarbon (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast.

Bei 37° C wurden die Proben in einem Schüttelwasserbad mit einer Frequenz von 72/min. bewegt. Nach 2 Stunden wurde mittels einer Tuberkulinspritze der Gummistopfen durchstoßen und 0,2 ml 10 n H_2SO_4 in die Inkubationsflüssigkeit gegeben. Nach diesem Reaktionsstop wurde in das Plastikschrälchen 0,4 ml 10 n NaOH injiziert. Die NaOH-Lösung ist ausreichend, um das entstandene Kohlendioxyd aus inaktiver und markierter Glucose zu binden. Im Anschluß an die NaOH Zugabe beließ ich die Proben für 30 min. im Wasserbad. Nach RENOLD ist die CO_2 -Bindung an NaOH dann abgeschlossen (18).

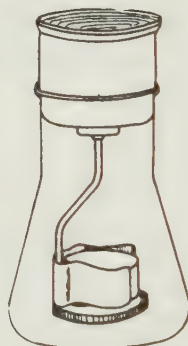
0,3 ml der zur Absorption verwandten NaOH wurden anschließend in 15 ml Szintillatortoluol und 15 ml Dioxan aufgenommen.

Nach Zugabe von 1 g Thixin wurde in einem Homogenisator (M.S.E. Ltd., Great Britain) über 2 min. homogenisiert. Von dem Homogenat wurden 2 mal 10 ml in Plastikbehälter abgefüllt (siehe Abb. 1). Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Tricarb-Modell 314 EX (Packard Instruments, Illinois, USA). Die Zählausbeute für C^{14} bei einer unteren Discriminatoreinstellung von 50 KeV und einer oberen von 500 KeV betrug 70 % der theoretischen Ausbeute.

Um die Fehlerbreite der Versuchsanordnung so klein als möglich zu halten, wurden die Proben im lateinischen Quadrat angeordnet (siehe Abb. 2). Das bedeutet, daß die für die Standardkurven



Behälter für die Messung
im Flüssigkeitsszintillator



Inkubationsfläschchen

Abb. 1 Fettgewebssegment, Puffer und Serum werden in das Inkubationsfläschchen aus Glas gegeben. NaOH wird in das an einer Metallöse befestigte Kunststoffnäpfchen appliziert. Der Kunststoffbehälter für die Messung im Flüssigkeitsszintillator nimmt 10 ml des Homogenats auf.

notwendigen Insulinkonzentrationen und die zu untersuchenden Seren unter weitgehend gleichartigen Verhältnissen in einem Ansatz jeweils 8 mal untersucht wurden.

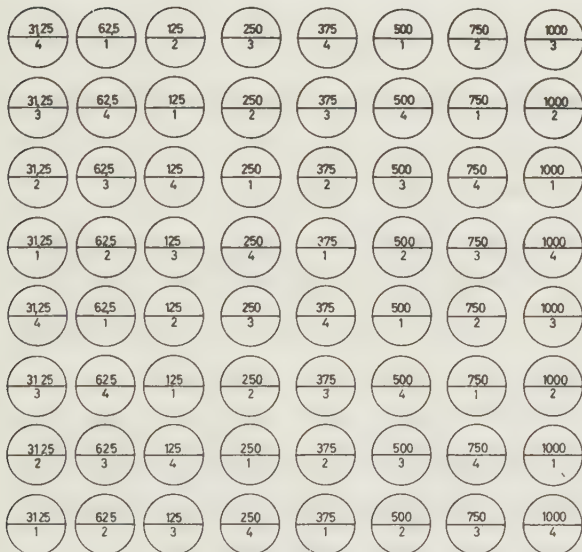


Abb. 2

Das lateinische Quadrat
Ein Kreis stellt eine Probe dar. Die Zahlen im oberen Feld eines Kreises sind die Insulinkonzentrationen in μ E/ml. Die Zahlen im unteren Feld eines Kreises sind der betreffende Teil des epididymalen Fetthanhangs.

- 1 = proximaler Teil
- 2 = medialer Teil
- 3 = medialer Teil
- 4 = distaler Teil

6. Koordinatensystem zur Ermittlung der insulin-like-activity

Für die Berechnung wurde von jeder Einzelprobe die Quadratwurzel der gemessenen Radioaktivitätsimpulse/min./mg Fett gebildet. Voraussetzung für eine Bewertung ist, daß von den gleichzeitig bestimmten Standardinsulinen der Logarithmus der Konzentrationen den Impulsen proportional ist und eine Gerade

ergibt. Dann ist es möglich, in einem halblogarithmischen Koordinatensystem, in dem auf der Ordinate die Quadratwurzel der Impulse/min./mg Fett und auf der Abszisse logarithmisch die Insulinkonzentrationen aufgetragen sind, mittels der Standardkurve die ILA abzulesen.

7. Verwandtes Tiermaterial zur quantitativen Insulinbestimmung

Quantitative Insulinbestimmungen wurden an Ratten und Hunden mit normalem Stoffwechsel durchgeführt.

Die verwandten Ratten stammten aus einem Inzucht Wistar-Stamm, waren stets männlich und hatten ein Versuchsgewicht von 90 ± 10 Gramm. Die Fütterung erfolgte mit Standardkost; Wasser wurde ad libitum verabreicht. Zu der entsprechend den Versuchsbedingungen bestimmten Zeit nach Applikation von Glycodiazin wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet. Die Blutgewinnung erfolgte durch Eröffnung der Carotiden. Nach MARTIN und RENOLD kann das auf die ILA-Konzentration zu untersuchende Blut bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen bleiben (19). Ich ließ das Blut bei Raumtemperatur nur bis zu 30 Minuten stehen, da sonst keine reproduzierbaren ILA-Werte gewonnen werden konnten.

Innerhalb dieses Zeitraumes wurde das Blut zentrifugiert und die Glucosekonzentration im Serum enzymatisch nach der Methode von HUGGET und NIXON untersucht (4).

Das Serum wurde in einer Tiefkühltruhe bei minus 17° C eingefroren, um erst unmittelbar vor Versuchsbeginn wieder auf-

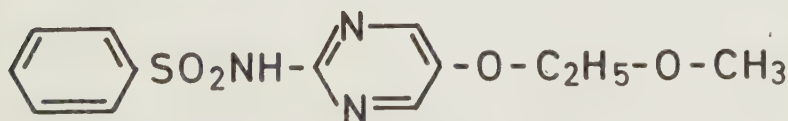
getaut zu werden. Die Insulinkonzentration bleibt unter diesen Bedingungen unverändert.

Von den Hunden - Geschlecht und Gewicht sind bei den einzelnen Versuchen angegeben - wurde Blut durch Punktion aus der V.femoralis gewonnen. Die Aufbereitung des Serums geschah analog zum Rattenblut.

Glycodiazin wurde bei Ratte und Hund oral mit Schlundsonde bzw. intravenös verabreicht.

8. Chemische Eigenschaften des Glycodiazins.

Strukturformel:



Summenformel: $C_{13}H_{15}N_3O_4S$

Molekulargewicht: 309

Löslichkeit des Na-Salzes in Wasser bei 37° C: 70,5 %

p_{ka} : 5,7

pH : 8,7

Für die Untersuchungen wurde ausschließlich das Natriumsalz des Glycodiazins verwandt.

III. Ergebnisse

1. Eichkurve

- a. Aufstellung und Fehlerberechnung der Eichkurve.
Streuungsbreite der Radioaktivitätsimpulse bei
unterschiedlichen Insulinaktivitäten.

Voraussetzung für die Bestimmung der ILA ist die Aufstellung einer Eichkurve mit kristallinem Insulin. Mit Hilfe dieser Eichkurve oder Standardkurve sind die unbekannten ILA-Werte ablesbar.

Da die Insulinkonzentration der Verdünnungsreihe die Genauigkeit der Methode bestimmt, verwandte ich 8 Meßpunkte für die Standardkurve. Als Meßpunkte setzte ich Insulinverdünnungen ein von 31,25 mikro E; 62,5 mikro E; 125 mikro E; 250 mikro E; 375 mikro E; 500 mikro E; 750 mikro E; 1000 mikro E. Gegenüber MARTIN, RENOLD und DITSCHUNEIT, die 6 Verdünnungen einsetzten (8,18,19), bringt der Einsatz von 2 zusätzlichen Meßpunkten eine Genauigkeitszunahme von 25 %. Damit erhöht sich allerdings für eine Versuchsserie die Probenzahl auf 64. Eine Fehlerberechnung für die Standardkurve (siehe Abb. 3) fertigte ich derart an, daß der absolute Fehler, die Differenz zwischen Kurvenverlauf im Meßpunkt und Meßpunkt selbst (Δy), und der Abstand zwischen Abszisse und Meßpunkt (y) als Verhältnisgleichung ($\frac{\Delta y}{y}$) den relativen Fehler, mit 100 multipliziert die Fehlerprocente ausdrückte.

Für die in Abb. 3 wiedergegebene Standardkurve ergeben sich im einzelnen folgende Fehler in Prozent.

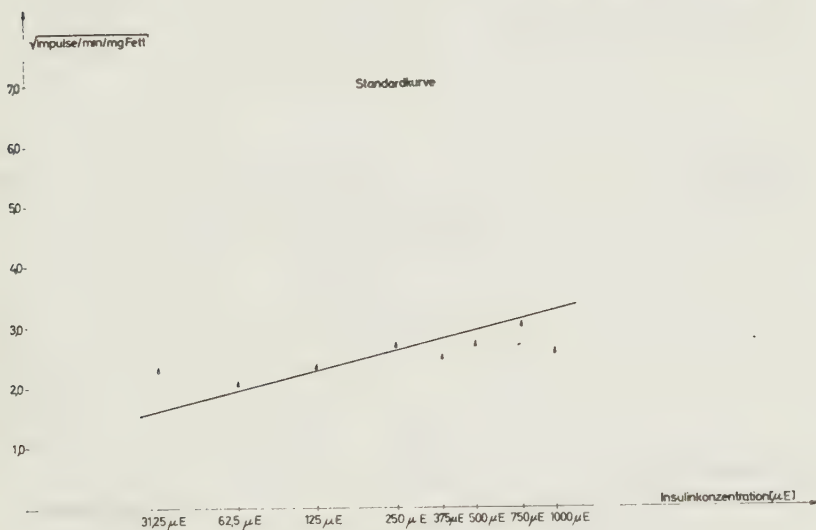


Abb. 3 Standardkurve. Die einzelnen Messpunkte stellen die Radioaktivitätsimpulszahl der Quadratwurzel der Impulse/min/mg Fett für die jeweilige Insulinkonzentration in einem halblogarithmischen System dar. Der wiedergegebene Mittelwert einer Insulinkonzentration ergibt sich aus 8 Einzelwerten.

mikro E Insulin	relativer Fehler	Fehler in %
31,25	0,298	29,8
62,50	0,058	5,8
125,00	0,034	3,4
250,00	0,026	2,6
375,00	0,114	11,4
500,00	0,082	8,2
750,00	0,032	3,2
1000,00	0,211	21,1

Der additive Wert für die Gesamtkurve beträgt 85,5 %, dividiert durch die 8 Meßpunkte ergibt sich demnach ein Gesamtfehler von 10,7 %.

Die Standardkurve hat in der angegebenen Koordinateneinteilung einen Anstieg von 14 Grad.

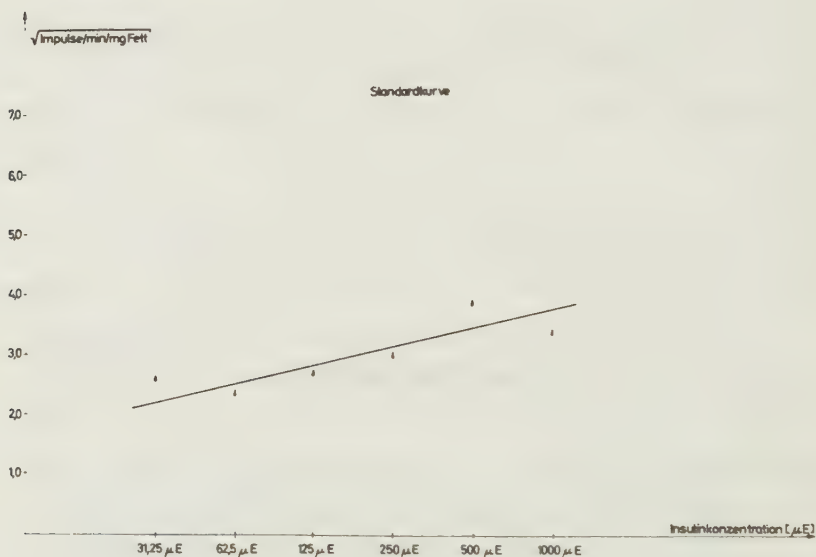


Abb. 4 Standardkurve wie in Abb. 3. Der Anstieg der Geraden wurde im Gegensatz zur Abb. 3 nicht aus 8, sondern nur aus 6 einzelnen Messpunkten ermittelt.

Die in Abb. 4 wiedergegebene Standardkurve aus 6 Meßpunkten hat einen Fehler von 11,11 %; ihr Anstieg beträgt 13 Grad.

In der Abb. 5 beträgt der Fehler 4,4 % bei einem Anstieg von 11 Grad.

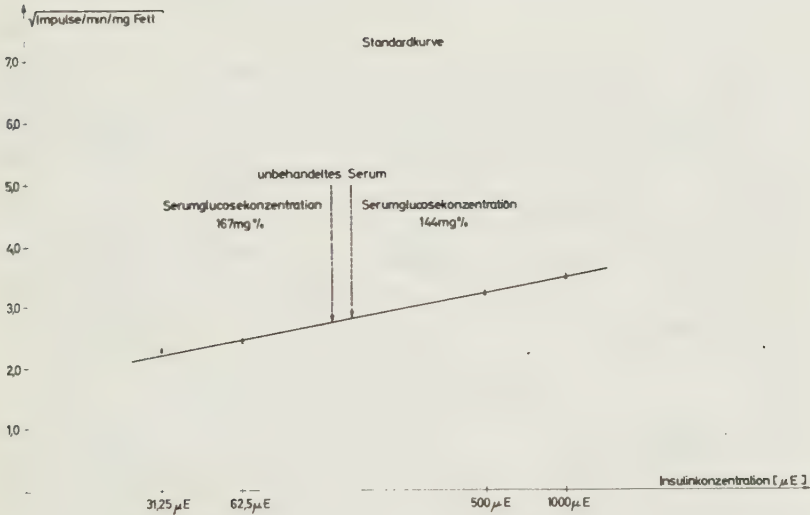


Abb. 5 Standardkurve wie in Abb. 3. Der Anstieg der Geraden wurde aus 4 Messpunkten ermittelt. Die Anstiegendifferenz zur Abb. 3 von nur 3 Grad ergibt beim Ablesen der ILA jedoch größere Abweichungen. In der Abb. 5 sind die Serumglucosekonzentrationen von zwei unbehandelten, keiner Nahrungskarenz ausgesetzten Rattenkollektionen wiedergegeben. Das Blut der 10 Ratten einer Kollektion kam vor der Messung in einen gemeinsamen Behälter. Die Pfeile weisen auf den Wert der Quadratwurzel der Radioaktivitätsimpulse/min/mg Fett, der für jede Tiergruppe gefunden wurde. Projiziert man diese Werte auf die Abszisse, dann erhält man die ILA in mikro Einheiten.

Die Abb. 6 gibt die Fehlerbreite der gemessenen Impulse/min/mg Fett bei den unterschiedlichen Insulinkonzentrationen wieder. Die graphische Darstellung zeigt, daß mit

steigender Insulinkonzentration die Streuung der Impulse/
min./mg Fett zunimmt.

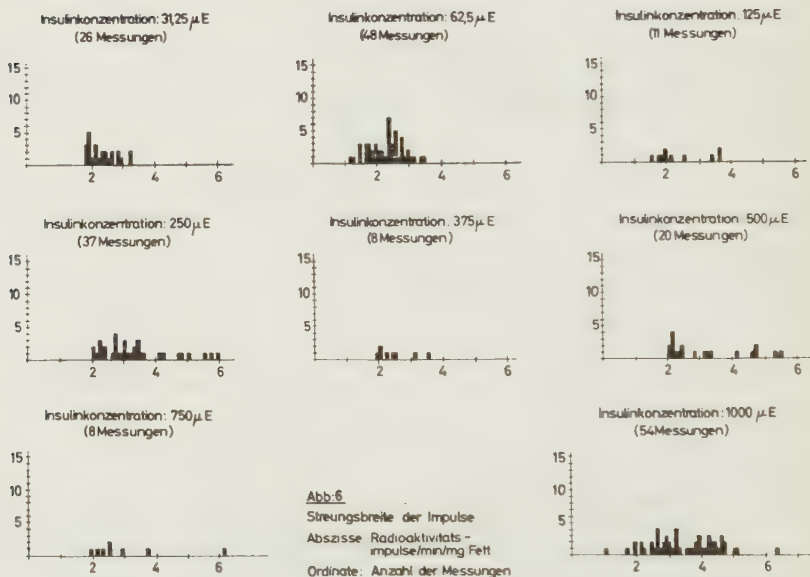


Abb. 6 Fehlerbreite der gemessenen Impulse/min./mg Fett bei Insulinkonzentrationen von 31,25 bis 1000 mikro Einheiten. Mit steigender Insulinkonzentration nimmt die Streuung der einzelnen Radioaktivitätsimpulse zu.

Die Untersuchungen bestätigen m.E. die Notwendigkeit, möglichst viele, in meinem Fall acht, Verdünnungsreihen der Insulinkonzentration einzusetzen.

b. Das Verhalten des Anstieges der Eichkurve und der Streuungsbreite der Radioaktivitätsimpulse bei einer Änderung der Aktivitätskonzentration der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose.

Da in der Literatur, bedingt durch unterschiedliche Meßmethodik der Radioaktivität, verschiedene Mengen von radioaktiv markierter Glucose eingesetzt wurden und gleichzeitig unterschiedliche Winkel der Standardkurven auffielen, untersuchte ich die Abhängigkeit des Anstieges von der Aktivitätskonzentration der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose.

Folgende Fragen mußten untersucht werden:

1. Wird durch die Anwendung höherer Aktivitätskonzentrationen die Streuungsbreite der Impulse einer Versuchsserie verringert ?
2. Wird durch größeren Anstieg der Standardkurve eine erhöhte Ablesegenauigkeit für die Insulinkonzentrationen und damit eine bessere Linearität der Standardkurve, insbesondere für die Insulinkonzentrationen im oberen Grenzbereich, erreicht ?

Bei der Rattenfettgewebismethode wird mit Glucose im Überschuß (300 mg %) gearbeitet. Es kommt bis zur Inaktivierung des Insulins zu einem größtmöglichen Abbau von Glucose. Dieser setzt sich aus dem Verhältnis der inaktiven zur aktiven Glucose zusammen. Wird die Aktivitätskonzentration erhöht, dann

muß es auch zu einer Vergrößerung der Molekülzahl und damit zu einer Steigerung der Impulszahl aus der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose kommen. Das bedeutet, daß die Änderung der Aktivität eine Änderung der Impulse/min./mg Fett im gleichen Verhältnis zur Folge hat.

Experimentell ließ sich nachweisen, daß die eingesetzte Radioaktivität die Auswertung beeinflussen kann. Da bei dem Arbeiten im Überschuß sämtliche aktiven Moleküle abgebaut werden, ist das Verhältnis zwischen eingesetzter Radioaktivität und gemessenen Impulsen/min./mg Fett gewahrt. Das trifft für alle Insulinkonzentrationen in dem untersuchten Bereich (31,25 - 1000 mikro E./ ml) zu.

In Abb. 7 wurde eine Standardkurve mit einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucosekonzentration mit 2,0 mikro Curie mit einer mit 0,08 mikro Ci verglichen. Das Radioaktivitätskonzentrationsverhältnis zwischen den beiden Standardkurven beträgt 1 : 25. Da zur Berechnung die Quadratwurzel der Impulse/ min./mg Fett verwendet wurde, war eine Änderung im Anstieg zwischen beiden Kurven im Verhältnis 1 : 5 zu erwarten.

Die eingesetzten Radioaktivitäten 1,0 mikro Ci (Abb. 8) und 0,08 mikro Ci verhalten sich wie 1 : 12,5. Das läßt einen Anstieg von 1 : 3,52 erwarten.

Mathematisch wurde für 1,0 mikro Ci ein Anstieg von 24,64 Grad ermittelt. Das Experiment ergab einen Anstieg von 24,7 Grad (siehe Abb. 8).

Wird also eine Radioaktivitätskonzentration der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose als Bezugssystem verwandt, dann ändern sich die Anstiege anderer Aktivitätskonzentrationen der $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose zu dem Anstieg des Bezugssystems linear und können durch Multiplikation

des Aktivitätskonzentrationsverhältnisses mit dem Anstieg des Bezugssystems ermittelt werden.

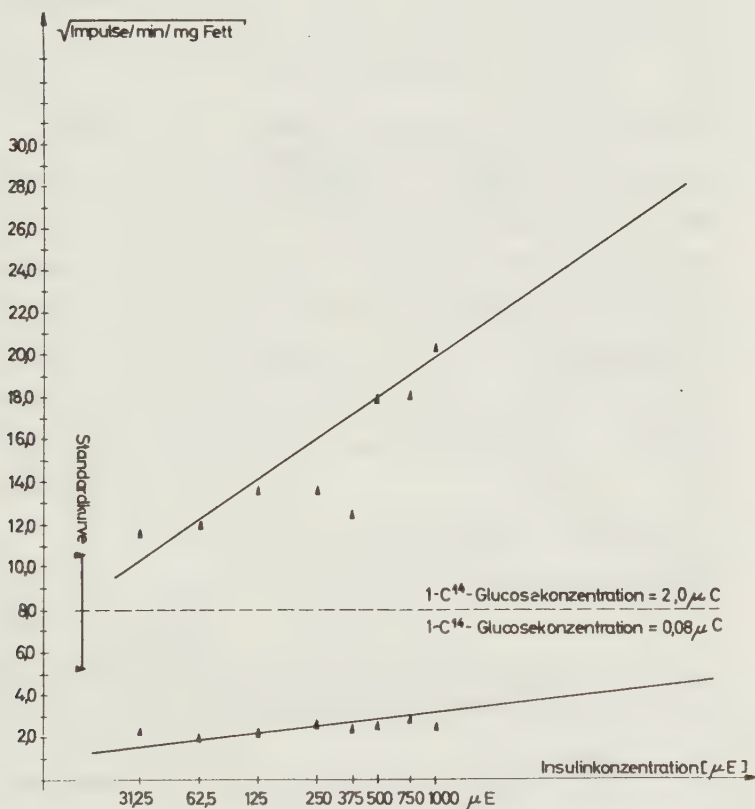


Abb. 7 Die Anstiegsänderung der Standardkurve und die Radioaktivitätsänderung der markierten Glucose stehen im gleichen Verhältnis. Aus der Abb. ist ersichtlich, dass mit steigender Aktivität der markierten Glucose auch die Streuung der einzelnen Messpunkte zunimmt.

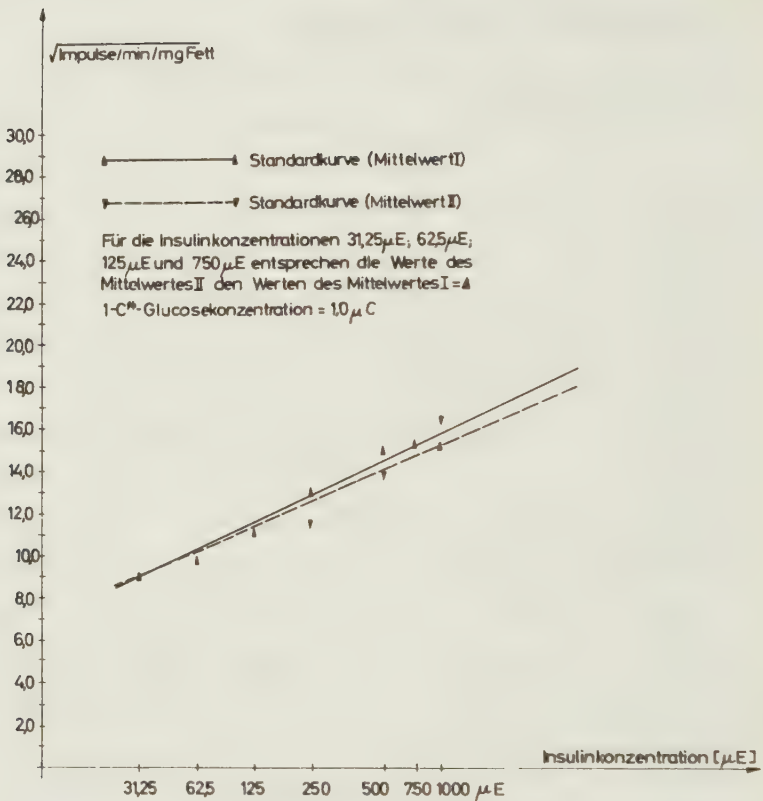


Abb. 8 Anstieg der Standardkurve in zwei Messungen bei einer Radioaktivitätskonzentration der markierten Glucose von 1,0 mikro Curie.

Als Gleichung formuliert bedeutet dies: $\alpha = \alpha' \sqrt{k \cdot G}$

α (Anstieg der Standardkurve der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose) = α' (Anstieg des Bezugssystems (z.B. 0,08 mikro Ci/0,1 ml) multipliziert mit der Quadratwurzel des Aktivitätskonzentrationsverhältnisses (k) der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose (G)).

Wird in einem Koordinatensystem auf der Ordinate der Anstieg der $1-^{14}\text{C}$ -Glucosestandardkurve in Grad, auf der Abszisse die Quadratwurzel des Konzentrationsverhältnisses der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose dargestellt und in dieses System die Anstiege der unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose eingetragen und diese Punkte untereinander verbunden, dann erhält man eine Gerade, die durch den Ursprung geht und die Funktion $y = 7x$ besitzt. Diese Funktion ist in Abb. 9 wiedergegeben.

In Abb. 10 ist der Beweis für die Einteilung der Abszisse der Abb. 9 und den aufgetragenen Konzentrationsverhältnissen der Aktivitäten erbracht.

Trägt man nämlich in einem Koordinatensystem auf der Ordinate das Konzentrationsverhältnis der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose und auf der Abszisse die Quadratwurzel des Konzentrationsverhältnisses der $1-^{14}\text{C}$ -Glucose ab, dann erhält man eine Parabel, die durch den Ursprung geht ($y = x^2$),

Die Funktion $y = 7x$ gibt die Möglichkeit, Versuchsergebnisse der Rattenfettgewebismethode, die mit unterschiedlichen Konzentrationen aktiver Glucose angefertigt wurden, untereinander zu vergleichen.

Zusammenfassend zu den eingangs gestellten Fragen läßt sich sagen:

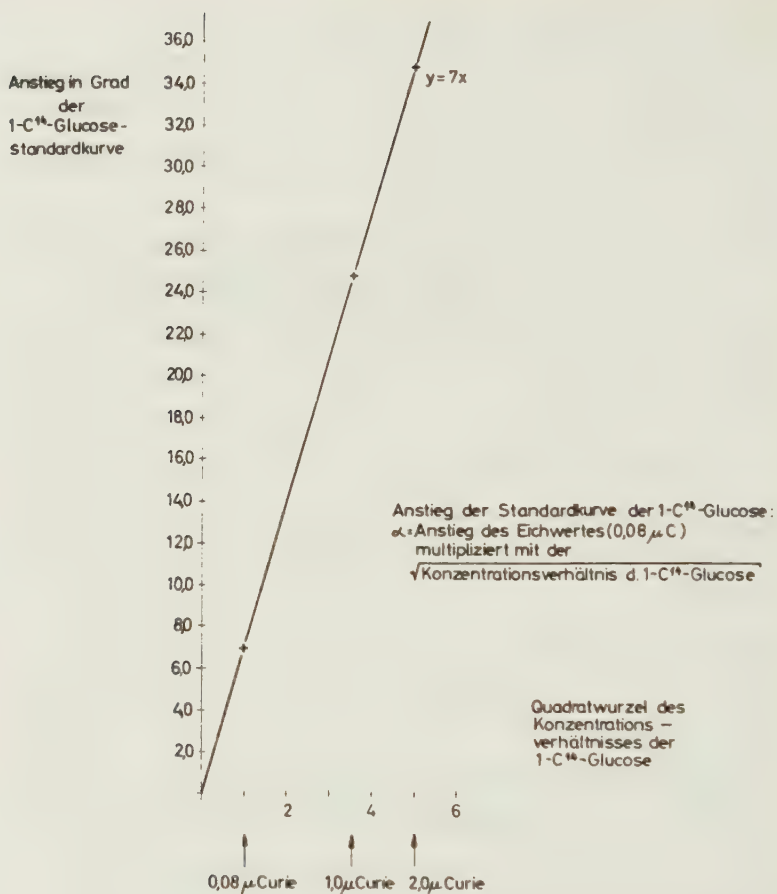


Abb. 9 Die Funktion $y = 7x$ wird in dieser Abb. bewiesen mit den Aktivitätskonzentrationen von 0,08 mikro Curie, 1,0 mikro Curie und 2,0 mikro Curie. Auf der Ordinate wurde der Anstieg in Grad der markierten Glucosestandardkurve, auf der Abszisse die Quadratwurzel des Konzentrationsverhältnisses der markierten Glucose abgetragen. Die Berechtigung, die Einteilung der Abszisse mit der Quadratwurzel vorzunehmen, ergibt sich aus dem Umstand, daß zur Berechnung der Impulse/min/mg Fett die Quadratwurzel verwendet wurde. Den Beweis hierfür gibt die Abb. 10.

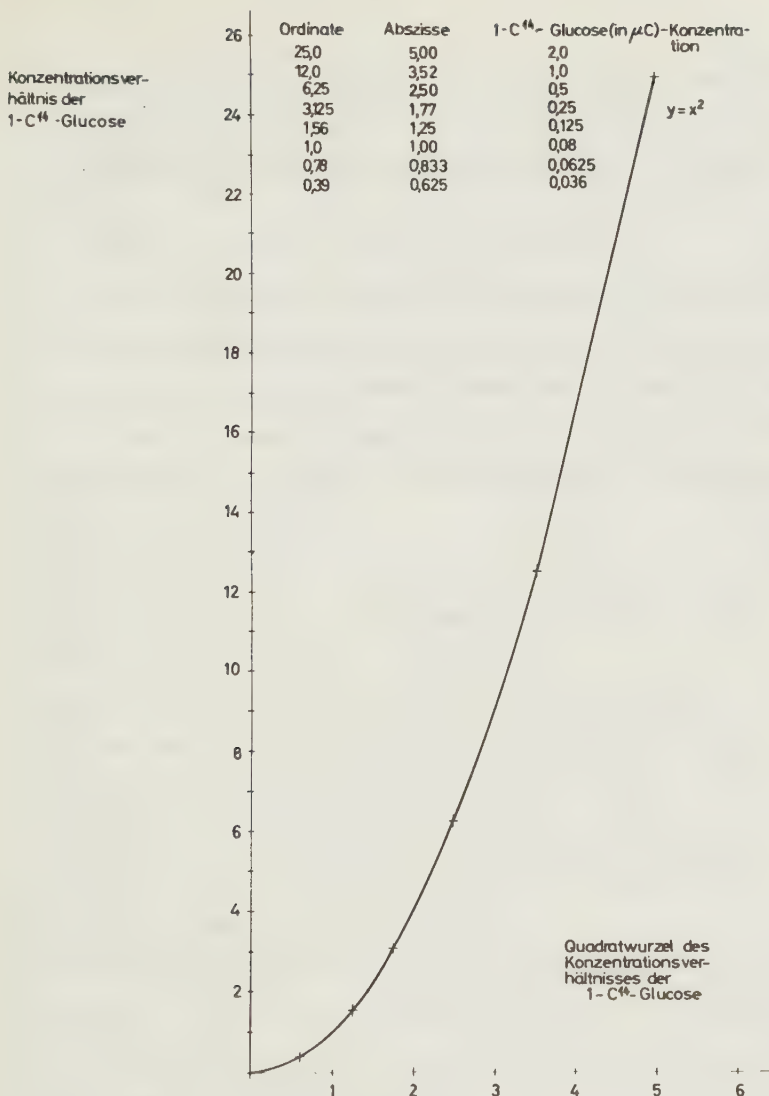


Abb. 10 Wählt man 0,08 mikro Curie der markierten Glucose als Bezugssystem (man kann von jeder beliebigen Aktivitätskonzentration ausgehen), trägt das Verhältnis zu anderen Glucosekonzentrationen auf der Ordinate, deren Quadratwurzel auf der Abszisse ab, dann erhält man eine Parabel, die durch den Ursprung geht. Dann wird durch die vorgenommene Einteilung der Abszisse in Abb. 9 keine Veränderung des Ergebnisses hervorgerufen.

Die Streuungsbreite der Impulse der Meßreihe einer Insulinkonzentration nimmt im gleichen Verhältnis wie die Aktivitätsänderung zu. Eine Verringerung der Streuungsbreite ist nicht zu verzeichnen.

Deshalb ist eine Verminderung der Zahl der eingesetzten Standardwerte nicht erlaubt. Mit höherer Aktivitätskonzentration der 1-¹⁴C-Glucose wird eine bessere Linearität im oberen Grenzbereich der Insulinkonzentration erreicht. Der relative Fehler der Standardkurve wird gemindert. Diese Aussage wird in den Beispielen Abb. 7 und Abb. 8 bewiesen.

2. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucosespiegel und ILA an Ratten nach Gabe von Glycodiazin per os in der Dosis 100 mg/kg Körpergewicht.

Nach zwölfstündiger Nahrungskarenz wurde Glycodiazin in der Dosis 100 mg/kg Körpergewicht an 90 ± 10 Gramm schweren männlichen Wistar-Ratten mit der Schlundsonde oral verabreicht. Zu den verschiedenen Tötungszeiten (15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min., 180 min., 240 min., 300 min., 360 min. und 420 min.) und für den Leerwert wurde jeweils ein Kollektiv - bestehend aus 10 Ratten - verwandt. Das Blut der 10 Ratten kam in einen gemeinsamen Behälter. Anschließend erfolgte die Untersuchung.

In der Tabelle 2 sind die für jeden Zeitraum gefundenen Glucosewerte und in der Tabelle 3 die insulin-like-activity dargestellt. Die graphische Darstellung zur Versuchsserie I ist die Abb. 11, die der Versuchsserie II in Abb. 12, der Versuchsserie III in Abb. 13 und der Versuchsserie IV in Abb. 14 dargestellt.

Bei den Kontrolltieren betrug die Glucosekonzentration durchschnittlich 100 mg%. Das entspricht den Arbeiten von KRAMER et al. (15).

In der Versuchsserie I war 30 min. nach Applikation von Glycodiazin die Blutzuckerkonzentration um 8,6 % abgesunken, erreichte nach 45 min. mit 50 % den geringsten Serumglucosespiegel und ist 60 min. nach Applikation nurmehr um 5,7 % dem Ausgangswert entfernt.

45 Minuten nach der Applikation zum Zeitpunkt der niedrigsten

Glucosekonzentration ist die ILA um 24,6 % erhöht.

In der Versuchsserie II sinkt die Glucosekonzentration nach 30 Minuten um 12,5 % und erreicht 60 min. p.a. mit 50 % den tiefsten Wert gegenüber dem Kontrollwert.

Die ILA ist 15 Minuten nach Applikation gegenüber dem Ausgangswert um 47,8 % erniedrigt, stellt sich 30 und 45 min. p.a. zum Normwert wieder ein und ist 60 min. p.a. um 69,2 % höher als der Kontrollwert.

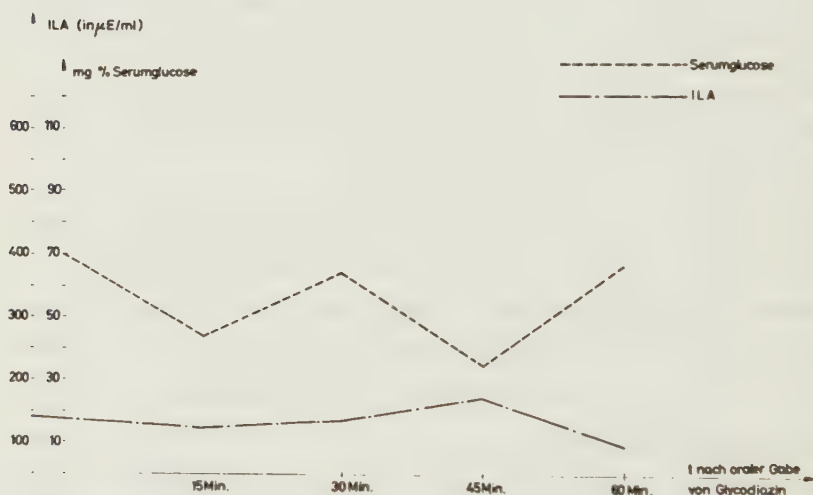


Abb. 11 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei der Ratte bis 60 Minuten nach per os Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin.

In der Versuchsserie III ist die Glucosekonzentration 30 Minuten p.a. um 29,5 % erniedrigt, erreicht ihren Tiefstand nach 60 min. mit 58,9 % und nach 3 Stunden mit 71,7 %

des Ausgangswertes.

Bereits 15 Minuten nach Applikation steigt die ILA um 23,6 % an. Nach 45 Minuten wird mit einer Steigerung von 51,7 % gegenüber dem Ausgangswert das Maximum erreicht. Zwischen 1 Stunde und 3 Stunden sind die ILA-Werte dem Ausgangswert gleichzusetzen.

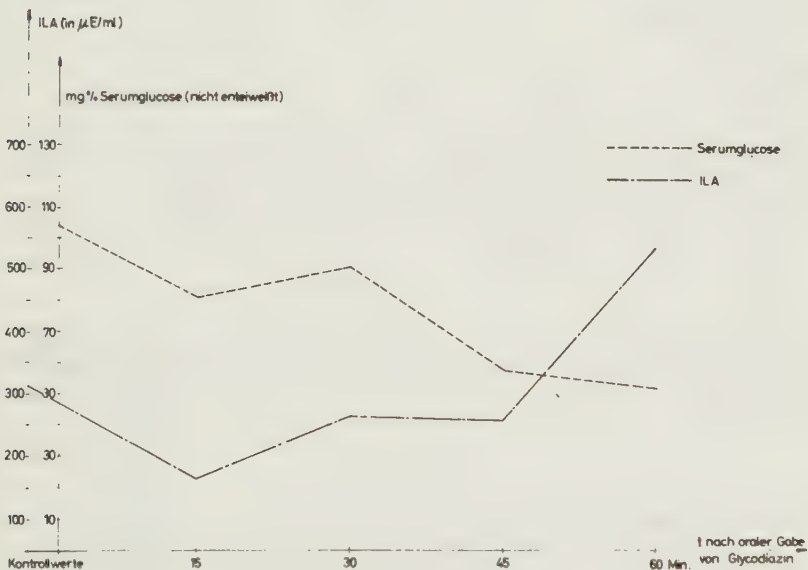


Abb. 12 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei der Ratte bis 60 Minuten nach per os Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin.

In der Versuchsserie IV wurden die Glucosekonzentrationen von der vierten bis zur siebten Stunde nach Glycodiazin-gabe untersucht. In diesem Bereich ist die Glucosekonzentration auf einem gleichbleibendem Niveau von 70 - 80 mg %

eingestellt.

Die ILA weist im gleichen Zeitraum Schwankungen mit großen Amplituden auf.

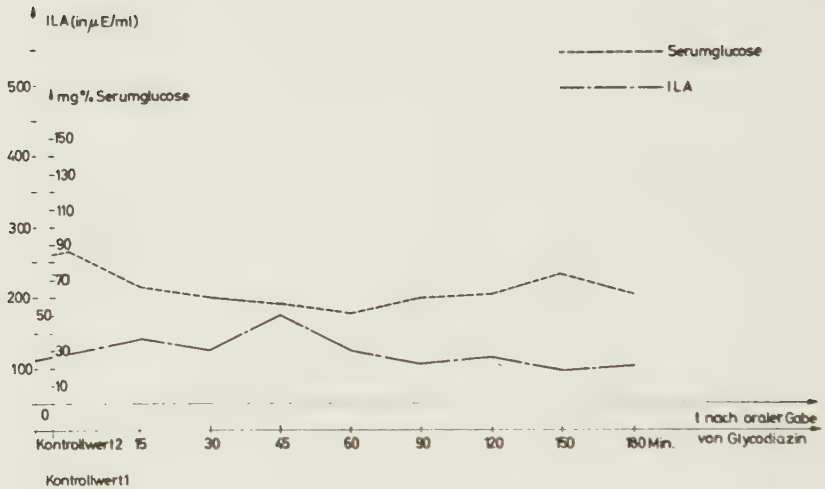


Abb. 13 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei der Ratte bis 180 Minuten nach per os Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin.

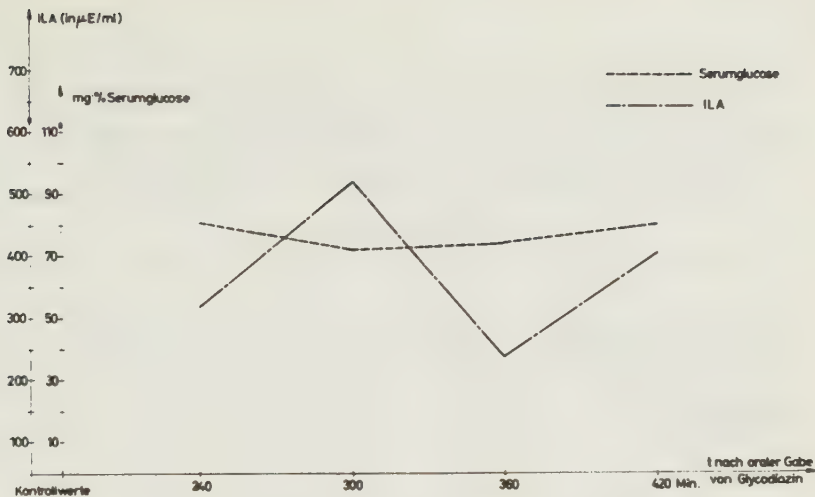


Abb. 14 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei der Ratte im Zeitraum von 240 bis 420 Minuten nach per os Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin.

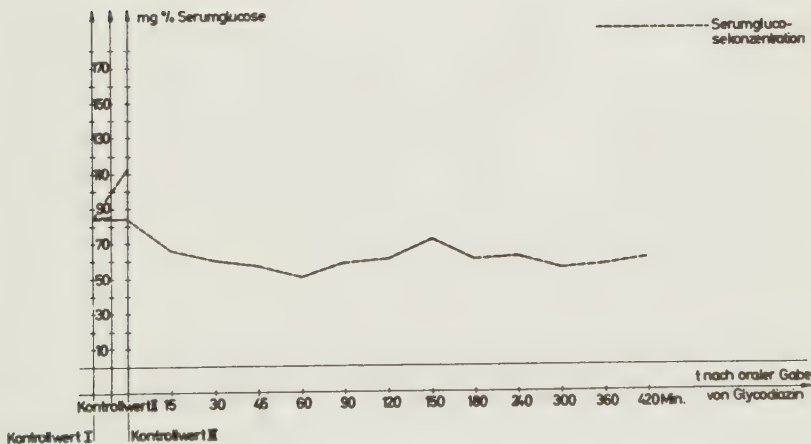


Abb. 15 Blutzuckersenkende Wirkung von 100 mg/kg Glycodiazin bei der Ratte während 7 Stunden.

Tabelle 2

Serumglucosekonzentration von vier Rattenkollektionen mit dem Einzelgewicht von 90 ± 10 Gramm nach per os Gabe von Glycodiazin in der Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht.

(in mg %)

Zeit in Minuten	Versuchs- serie I	Versuchs- serie II	Versuchs- serie III	Versuchs- serie IV
Kontroll- wert	70	104	85	112
15	44	81	66	-
30	64	91	60	-
45	35	58	56	-
60	66	52	50	-
90	-	-	59	-
120	-	-	61	-
150	-	-	72	-
180	-	-	61	-
240	-	-	-	81
300	-	-	-	72
360	-	-	-	74
420	-	-	-	80

Tabelle 3

Insulin-like-activity von vier Rattenkollektionen mit dem Einzelgewicht von 90 ± 10 Gramm nach per os Gabe von Glycodiazin in der Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht.

(in mikro Einheiten/ml)

Zeit in Minuten	Versuchs- serie I	Versuchs- serie II	Versuchs- serie III	Versuchs- serie IV
Kontroll- wert	138	312	114	624
15	121	163	141	-
30	133	260	124	-
45	172	256	173	-
60	95	528	124	-
90	-	-	106	-
120	-	-	111	-
150	-	-	93	-
180	-	-	100	-
240	-	-	-	320
300	-	-	-	519
360	-	-	-	237
420	-	-	-	402

3. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucosespiegel und ILA an Hunden nach Gabe von Glycodiazin per os in der Dosis von 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

Die Hunde, die 100 oder 200 mg/kg Glycodiazin p.o. erhielten, waren männlichen Geschlechts und besaßen ein durchschnittliches Körpergewicht von 12 kg. Glucose und ILA Bestimmungen wurden in kurzfristigen Abständen zwischen 5 und 420 Minuten p.a. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt. Die graphische Darstellung der Versuchsreihe an dem Hund Nr. 1 ist die Abb. 16, der an dem Hund Nr. 5 die Abb. 17.

Bei den Kontrolltieren betrug die Glucosekonzentration durchschnittlich 100 mg% (siehe Tabelle 4).

In der Versuchsreihe an dem Hund Nr. 1 war 30 Minuten nach Gabe von Glycodiazin der Blutzucker um 35,1 % gegenüber dem Ausgangswert abgesunken, behält diesen Wert annähernd bis 240 Minuten p.a. bei, um bei 300 Minuten nach Glycodiazingabe den Tiefstwert mit 48,9 % des Ausgangswertes zu erreichen.

Die ILA zeigt im gleichen Zeitraum stärkere Schwankungen, ist 90 Minuten p.a. um 176,9 % gegenüber dem Ausgangswert erhöht, zeigt in der Zeit von 120 - 240 Minuten einen etwas unter dem Kontrollwert liegenden fast gleichbleibenden Wert, um bei 300 Minuten p.a. mit 27,9 % über den Kontrollwert zu steigen.

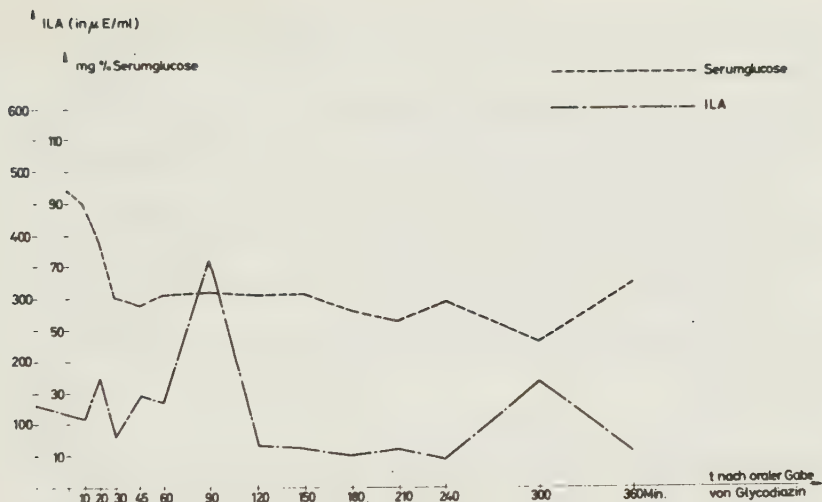


Abb. 16 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei dem Hund während 360 Minuten nach per os Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin.

In der Versuchsreihe des Hundes Nr. 2 sinkt die Glucose kontinuierlich ab und liegt 150 Minuten p.a. 20,7 % unter dem Kontrollwert, steigt bei 200 Minuten p.a. um 8 mg% gegenüber 150 Minuten an, um den tiefsten Wert bei 360 Minuten nach Versuchsbeginn mit 39,2 % unter dem Kontrollwert zu erreichen.

Die ILA weist 30 Minuten p.a. noch keine Veränderung auf, sinkt dann kontinuierlich, um bei 200 Minuten p.a. das Minimum mit 29,7 % des Ausgangswertes zu besitzen. Sie steigt 420 Minuten p.a. auf einen Wert an, der um 56,2 % höher als der Kontrollwert ist.

Hund Nr. 3 zeigt 15 Minuten p.a. keine Glucoseveränderung, dann fällt diese zuerst schnell ab, um nach weiterem lang-

samen Abfall bei 180 Minuten p.a. auf 39,9 % des Ausgangswertes zu sinken.

Die ILA hat ihren Höchstwert 30 Minuten p.a. mit 339,3 % über dem Kontrollwert, sinkt anschließend auf einen niedrigeren, gleichbleibenden Wert ab und erreicht 240 Minuten nach Glycodiazingabe wieder den Stand wie bei 30 Minuten.

Bei dem Hund Nr. 4 wurde gegenüber dem Kontrollwert ein fast gleichbleibender Glucosegehalt des Serums über 6 Stunden beobachtet.

Die ILA verändert sich die ersten 150 Minuten p.a. nicht, erreicht aber bei 180 Minuten einen um 181,6 % höheren Wert als die Kontrollmessung und sinkt dann bis 360 Minuten p.a. langsam ab.

Dem Hund Nr. 5 wurde das Glycodiazin in einer Konzentration von 200 mg/kg gegeben (siehe Abb. 17).

Die Serumglucose sinkt mit geringfügigen Schwankungen langsam ab, hat ihren niedrigsten Wert 150 Minuten p.a. mit 36,6 % unter dem Kontrollwert und steigt dann langsam an. 360 Minuten nach Versuchsbeginn liegt die Glucosekonzentration nur noch 3 mg% unter dem Ausgangswert.

Die ILA steigt 10 - 20 Minuten p.a. um 325,7 % über den Kontrollwert an. Bereits 30 Minuten nach Beginn fällt sie auf 71 mikro Einheiten, das sind 70,3 % des Ausgangswertes, erreicht 120 Minuten p.a. einen Tiefstwert mit 37,6 % der Kontrolle, steigt kurzfristig bei 150 Minuten auf 97,0 % an, um bei 360 Minuten p.a. den Wert von 120 Minuten wieder zu erreichen.

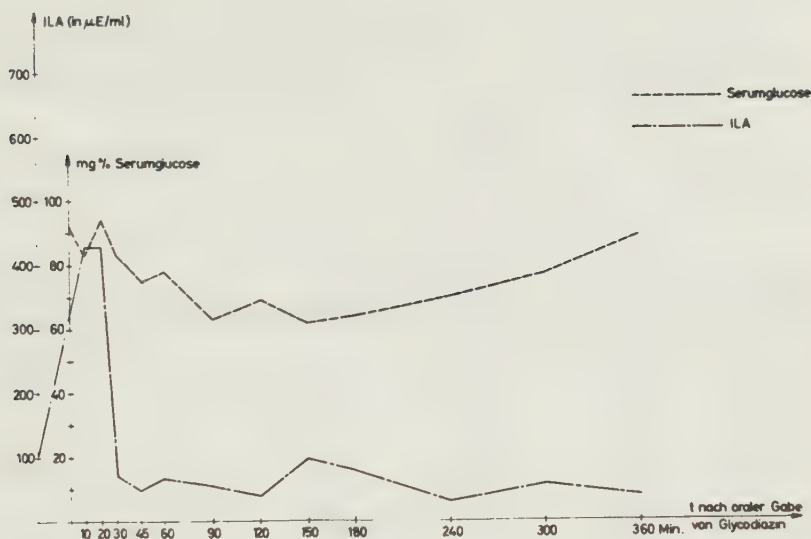


Abb. 17 Veränderung der Serumglucosekonzentration und der ILA bei dem Hund während 360 Minuten nach per os Gabe von 200 mg/kg Glycodiazin. Während die ILA bei einer Dosis von 100 mg/kg ihr Maximum erst 90 Minuten p.a. erreicht (Abb. 16), beobachtet man es bei einer Dosis von 200 mg/kg bereits nach 10 Minuten. Tritt bei einer Dosis von 100 mg/kg zwischen 240 und 360 Minuten noch einmal ein nennenswerter Anstieg der ILA auf, so ist dieser bei einer Dosis von 200 mg/kg nicht zu finden.

Tabelle 4

Serumglucosekonzentration von fünf Hunden mit dem Durchschnittsgewicht von 12 kg nach per os Gabe von Glycodiazin in der Dosis von 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

(in mg%)

Zeit in Minuten	Glycodiazin in der Konzentration				
	Hund Nr.1	Hund Nr.2	Hund Nr.3	Hund Nr.4	Hund Nr.5
Kontrollwert	94	92	122	77	92
5	-	-	121	-	-
10	90	-	107	109	83
15	-	87	109	-	-
20	78	-	-	76	94
30	61	79	83	59	83
45	58	-	-	78	75
60	61	88	56	82	78
90	62	88	57	61	63
120	61	80	59	74	69
150	61	73	55	82	62
180	56	74	45	80	64
200	-	81	-	-	-
210	53	-	-	-	-
240	59	70	61	105	70
300	46	-	-	72	77
360	65	56	-	66	89
420	-	62	-	-	-

Tabelle 5

Insulin-like-activity von fünf Hunden mit dem Durchschnittsgewicht von 12 kg nach per os Gabe von Glycodiazin in der

Dosis von 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

(in mikro Einheiten / ml)

Zeit in Minuten	Glycodiazin in der Konzentration				
	Hund Nr.1	Hund Nr.2	Hund Nr. 3	Hund Nr. 4	Hund Nr.5
Kontrollwert	130	101	33	76	101
5	-	-	31	-	-
10	110	-	50	55	430
15	-	93	73	-	-
20	174	-	-	60	426
30	81	104	145	49	71
45	148	-	-	58	49
60	133	98	122	27	66
90	360	88	129	36	55
120	69	74	109	31	38
150	66	77	136	73	98
180	52	34	-	214	79
200	-	30	-	-	-
210	63	-	-	-	-
240	48	46	142	206	30
300	166	-	-	110	57
360	57	47	-	158	39
420	-	158	-	-	-

4. Experimentelle Untersuchungen über die Veränderungen von Serumglucosespiegel und ILA an Hunden nach Gabe von Glycodiazin intravenös in der Dosis von 50 mg/kg, 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

In den Tabellen 6 und 7 sind die Ergebnisse der intravenösen Verabreichung des Glycodiazins an Hunde wiedergegeben. Untersucht wurden folgende Dosen: 50 mg/kg (Hund 6 und 7), 100 mg/kg (Hund 8 und 9) und 200 mg/kg (Hund 10).

Die graphische Darstellung für Hund Nr. 6 ist die Abb. 18, für Hund Nr. 9 die Abb. 19 und für Hund Nr. 10 die Abb. 20.

Hund Nr. 6 erreicht den tiefsten Glucosewert bei 30 Minuten p.a. mit 42,4 % der Ausgangsmessung, der - von geringfügigen Schwankungen abgesehen - als gleichbleibendes Niveau bis 120 Minuten nach Versuchsbeginn beibehalten wird. Langsam ansteigend erreicht die Glucose dann bei 360 Minuten p.a. 75,7 % der Kontrollmessung.

Die ILA hat nach kleinen Schwankungen bei 40 Minuten nach Beobachtungsbeginn den tiefsten Wert mit 25,8 % des Kontrollwertes erreicht, stellt sich zwischen 50 und 100 Minuten auf ein Niveau von durchschnittlich 66 % ein, erreicht ihr Maximum 150 Minuten p.a. mit 55 % über der Ausgangsmessung und fällt 4 Stunden nach Beginn wieder zum Anfangswert ab.

Bei dem Hund Nr. 7 wird der geringste Glucosegehalt des Serums nach 45 Minuten p.a. erreicht mit 40 % des Ausgangswertes.

Nach 3 Stunden ist letzterer wieder erreicht.

Die ILA steigt kontinuierlich an, erreicht den ersten Höchstwert 90 Minuten nach Beginn und nach kurzem Abfall das Maximum

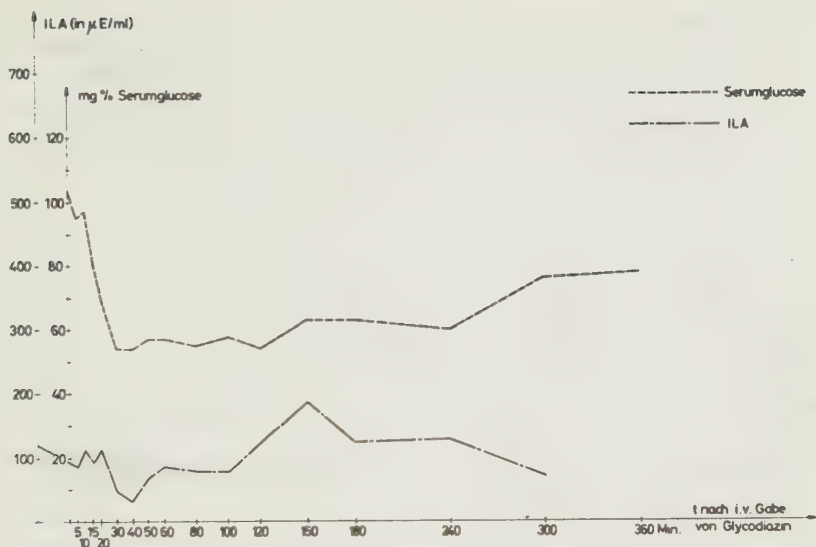


Abb. 18 Veränderungen der Serumglucosekonzentration und der ILA während 300 bzw. 360 Minuten nach i.v. Gabe von 50 mg/kg Glycodiazin.

bei 180 Minuten mit 437,5 % über dem Kontrollwert. Nach 6 Stunden ist ungefähr der doppelte Wert des letzteren erreicht.

Hund Nr. 8 zeigt einen leichten Glucoseanstieg, der sein Maximum 4 Stunden p.a. mit 16,3 % über dem Ausgangswert erreicht und dann abfallend 6 Stunden p.a. mit 70,2 % unter dem Anfangswert liegt.

Die ILA erreicht ihr Maximum bereits nach 30 Minuten mit einem Wert, der 126,8 % über dem Ausgangswert liegt; anschließend wurde ein Abfallen beobachtet.

Hund Nr. 9 ließ einen kontinuierlichen Glucoseabfall im Serum erkennen. Nach 30 - 60 Minuten p.a. wird die niedrigste Konzentration mit einem Glucosegehalt von 53,1 % vom Kontrollwert erreicht ; dieser steigt darauf langsam an und befindet sich

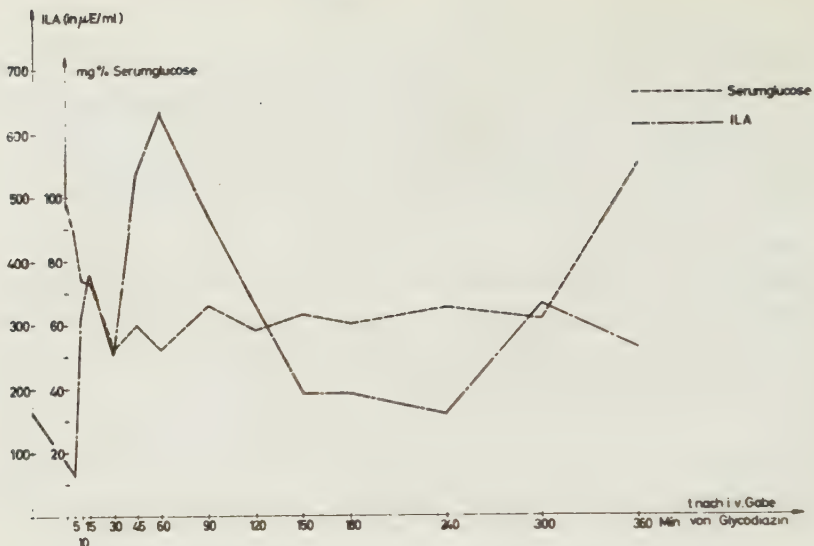


Abb. 19 Veränderungen der Serumglucosekonzentration und der ILA während 360 Minuten nach i.v. Gabe von 100 mg/kg Glycodiazin. Die Glucose sinkt rasch während der ersten 30 Minuten, behält dann die niedrige Konzentration bis 300 Minuten p.a. bei und steigt dann schnell an. Ebenso schnell steigt die ILA während der ersten 150 Minuten an.

bis 300 Minuten p.a. auf einem fast gleichbleibendem Niveau von 62,6 % des Ausgangswertes. Bei 360 Minuten nach Gabe von Glycodiazin wird der Leerwert wieder erreicht.

Die ILA ließ nach einem fast gleichmäßigen Anstieg 60 Minuten nach Versuchsbeginn den Höchstwert mit 198,7 % über dem Kontrollwert erkennen. Anschließend wurde ein langsamer Abfall auf ungefähr das Doppelte des Kontrollwertes beobachtet.

Bei dem Hund Nr. 10 ist ein Glucoseabfall bis zu 6 Stunden p.a. zu verzeichnen. Bei 4 Stunden nach Beobachtungsbeginn hat die Glucosekonzentration des Serums das Minimum von 37,7 % von Ausgangswert erreicht.

Die ILA erreicht einen Tiefstwert bereits 10 Minuten nach Versuchsbeginn mit 39,2% vom Ausgangswert und besitzt die Konzentration des letzteren wieder nach 4 Stunden.

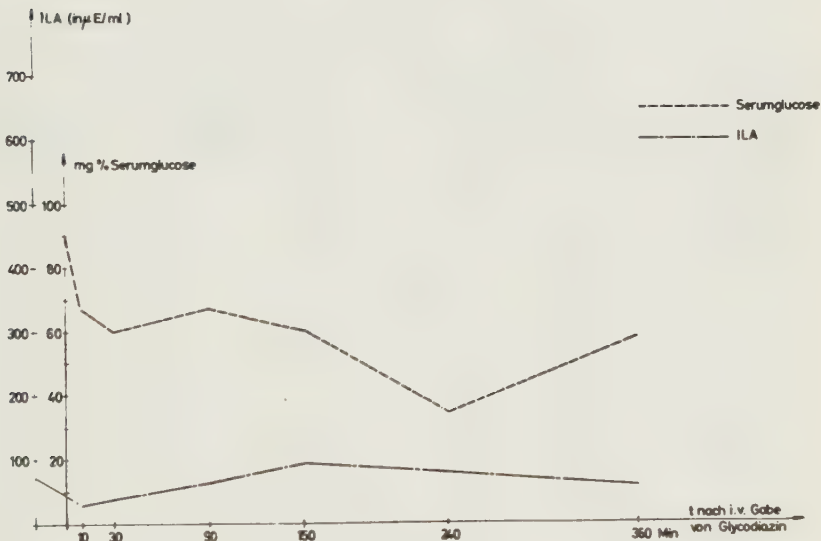


Abb. 20 Veränderungen der Serumglucosekonzentration und der ILA während 360 Minuten nach i.v. Gabe von 200 mg/kg Glycodiazin. Der Blutzucker sinkt nicht so schnell wie bei i.v. Gaben in den Dosen 50 oder 100 mg/kg. Auch sind die Veränderungen der ILA geringer als bei den genannten Konzentrationen.

Tabelle 6

Serumglucosekonzentration von fünf Hunden mit dem Durchschnittsgewicht von 12 kg nach intravenöser Gabe von Glycodiazin in der Dosis von 50 mg/kg, 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

(in mg %)

Zeit in Minuten	Glycodiazin in der Konzentration				
	50 mg/kg Hund Nr.6	50 mg/kg Hund Nr.7	100 mg/kg Hund Nr.8	100 mg/kg Hund Nr.9	200 mg/kg Hund Nr.10
Kontroll- wert	103	110	104	98	90
5	95	108	-	90	-
10	97	97	107	74	67
15	81	89	-	73	-
20	70	-	-	-	-
30	54	62	104	52	60
40	54	-	-	-	-
45	-	44	-	60	-
50	57	-	-	-	-
60	57	49	-	52	-
80	55	-	-	-	-
90	-	63	120	66	67
100	58	-	-	-	-
120	54	63	-	58	-
150	63	-	115	63	60
180	63	104	-	60	-
240	60	116	121	65	34
300	76	93	-	61	-
360	78	102	73	109	58

Tabelle 7

Insulin-like-activity von fünf Hunden mit dem Durchschnittsgewicht von 12 kg nach intravenöser Gabe von Glycodiazin in der Dosis von 50 mg/kg, 100 mg/kg oder 200 mg/kg Körpergewicht.

(in mikro Einheiten / ml)

Zeit in Minuten	Glycodiazin in der Konzentration				
	50 mg/kg		100 mg/kg		200 mg/kg
	Hund Nr.6	Hund Nr.7	Hund Nr.8	Hund Nr.9	Hund Nr.10
Kontrollwert	120	80	108	158	74
5	86	91	-	63	-
10	111	110	225	314	29
15	93	158	-	378	-
20	114	-	-	-	-
30	48	236	245	252	34
40	31	-	-	-	-
45	-	220	-	535	-
50	69	-	-	-	-
60	86	236	-	630	-
80	80	-	-	-	-
90	-	390	124	470	61
100	79	-	-	-	-
120	121	314	-	330	-
150	186	-	230	190	94
180	124	430	-	190	-
240	127	157	157	158	78
300	71	220	-	330	-
360	-	148	147	260	57

5. Der Einfluss wiederholter Blutentnahmen auf Glucose und ILA bei einem unbehandeltem Hund.

Um Schwankungsbreite und Einfluß wiederholter Blutentnahmen auf Glucose und ILA festzustellen, habe ich an einem Hund, dem innerhalb von 4 Stunden 10 mal Blut entnommen wurde, beide Größen bestimmt. Glucosekonzentration und ILA sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Die Glucosekonzentration bleibt im Mittel mit 110 mg % weitgehend konstant. Der Mittelwert der 10 ILA Bestimmungen beträgt 94 ± 28 mikro Einheiten (siehe Abb. 21).

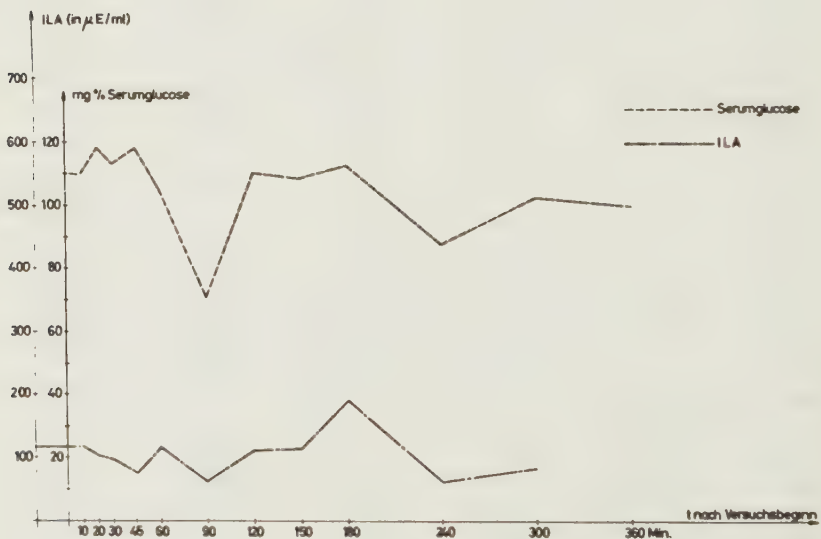


Abb. 21 Veränderungen von Serumglucose und ILA bei einem unbehandeltem Hund während 300 Minuten; der Blutzucker zeigt stärkere Schwankungen bei 90 und 240 Minuten nach Versuchsbeginn, behält sonst jedoch den Kontrollwert bei.

Tabelle 8

Serumglucosekonzentration und insulin-like-activity

von einem Hund (Kontrolltier)

Serumglucosekonzentration in mg %

Insulin-like-activity in mikro Einheiten / ml

Zeit in Minuten	Serumglucose- konzentration	ILA
10	110	117
20	118	104
30	113	98
45	118	76
60	105	119
90	71	63
120	110	112
150	108	113
240	87	63
300	102	79

IV. Diskussion

Meine Aufgabe war es, den Einfluß einer oral antidiabetisch wirksamen Verbindung - 2-Benzolsulfonamido-5(beta-methoxy-äthoxy)-pyrimidin - auf die ILA an zwei Tierarten - Ratte und Hund - zu untersuchen.

Die blutzuckersenkende Wirkung von Glycodiazin setzt das Vorhandensein von endogenem Insulin voraus. Eine Veränderung der ILA Konzentration im Serum unter Glycodiazinapplikation sollte demnach Ausmaß und Ablauf einer resultierenden Insulinausschüttung erkennen lassen. Als Methode zum Insulinnachweis verwandte ich die von MARTIN und RENOLD zuerst beschriebene Rattenfettgewebismethode. Mit dieser Methode lassen sich kleinste Insulinmengen mit Hilfe der Oxydation von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose zu $^{14}\text{CO}_2$ quantitativ nachweisen.

Gegenüber der Versuchsdurchführung von RENOLD und von DIT-SCHUNEIT habe ich die Versuchsanordnung modifiziert. Da die Linearität der Standardkurve entscheidend ist für die genaue Reproduktion der ILA, habe ich deren Berechnung aus acht verschiedenen Insulinkonzentrationen eingeführt.

Die Unterteilung des epididymalen Fettanhangs wurde in vier Segmenten vorgenommen und die Reproduzierbarkeit der Werte in Abhängigkeit vom Fettgewicht untersucht. Da die Anordnung der Versuche im lateinischen Quadrat erfolgte (siehe Abb. 2), ergibt sich als weiterer Vorzug, daß für jeden Meßpunkt nunmehr 8 Radioaktivitätsmessungen/min/mg Fett auswertbar sind.

Dies trägt zweifelsfrei zur Minderung des statistischen Fehlers bei.

Zu einer methodischen Grundlagenuntersuchung wurde der Einfluß verschiedener spezifischer Radioaktivität der etikettierten Glucose untersucht. Mathematisch und durch das Experiment belegt wurde gefunden, daß die spezifische Aktivität die Auswertung nicht beeinflußt. Lediglich im Insulinkonzentrationsbereich von 1000 mikro Einheiten/ml wird gegenüber den geometrisch abfallenden Konzentrationen eine bessere Linearität erreicht.

Im Tierexperiment wurde Glycodiazin nach 12-stündiger Nahrungskarenz an Ratten oral in der Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die nach HUGGET und NIXON durchgeführte Blutzuckerbestimmung zeigte nach 45 - 60 Minuten p.a. das Maximum der Hypoglykämie und gegenüber den Ausgangswerten eine Senkung um 36,4 %. Es erfolgte dann eine Einstellung auf ein ungefähr gleichbleibendes Niveau. Nach 180 Minuten p.a. zeigte sich eine Senkung um 28,2 %, nach 420 Minuten eine solche von 28,6 % gegenüber dem Ausgangswert.

Es fiel auf, daß in allen Versuchsserien im Anschluß an den ersten hypoglykämischen Effekt ein Ansteigen des Blutzuckers erfolgte, und zwar zwischen 60 und 150 Minuten nach Versuchsbeginn. Für diesen Anstieg scheint nicht der Ausgangswert der Glucosekonzentration ausschlaggebend zu sein, sondern die Höhe der Konzentrationserniedrigung und die Zeit, in der diese stattfindet. Die Differenz zum Kontrollwert lag hier zwischen

23 und 32 mg %. Als Ursache wird ein Gegenregulationsmechanismus vermutet, der eine Adrenalinfreisetzung zur Folge hat. KRAMER zeigte, daß nebennierenlose Ratten gegen die blutzuckersenkende Wirkung des Glycodiazins empfindlicher sind, als intakte Tiere.

Der Verlauf der ILA folgt den Schwankungen der Serumglucose mit einer zeitlichen Verzögerung, die allerdings keine Gesetzmäßigkeit erkennen läßt. Bei der Ratte beobachtet man 45 Minuten nach Applikation eine durchschnittliche Steigerung der ILA um 38,2 %; nach 60 Minuten findet man eine Senkung der ILA um durchschnittlich 31,2 %, nach 150 Minuten eine solche um 18,5 %, nach 420 Minuten eine ILA-Senkung um 35,6 % gegenüber dem Ausgangswert. In einem Fall sahen wir 60 Minuten p.a. eine Steigerung der ILA um 87,7 %.

An Hunden wurden Glucosekonzentration und ILA nach oraler Gabe von 100 und 200 mg/kg Körpergewicht untersucht; bei i.v. Gabe wurden Konzentrationen von 50, 100 und 200 mg/kg Glycodiazin verwandt.

Nach oraler Gabe ließ sich am hypoglykämischen Effekt keine Dosismäßigkeitsbeziehung zwischen 100 und 200 mg/kg feststellen. Nach 150 - 180 Minuten war der Blutzucker um 57,8 % gegenüber dem Ausgangswert gesunken. Nach 6 - 7 Stunden Beobachtungszeit kehrte die Blutzuckerkonzentration nur bei 1 von 5 Hunden zum Ausgangswert zurück, während bei den übrigen Hunden der Blutzucker noch um ungefähr 30 % gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt war. Die von KRAMER mitgeteilte Beobachtung, daß der hypoglykämische Effekt nach i.v. Verabreichung gegenüber der oralen kürzer anhält, wird gleichfalls gefunden. Nach

i.v. Verabreichung von 50 mg/kg war gegenüber dem Ausgangswert die Glucosekonzentration am tiefsten Wert um 53,8 %, nach 100 mg/kg um 53,0 % und nach 200 mg/kg um 62,3 % vermindert. Nach 4 - 6 Stunden war die Glucosekonzentration bei 2 von 5 Hunden wieder zur Norm zurückgekehrt, während bei den verbleibenden 3 Hunden nach 5 - 6 Stunden bei einer Konzentration des Glycodiazins i.v. von 50 mg/kg der Blutzucker noch um 24,3 %, bei 100 mg/kg um 37,8 % und bei 200 mg/kg um 35,6 % gegenüber dem Ausgangswert gesunken war.

Die ILA ließ weder nach oraler noch nach i.v. Verabreichung eine gesetzmäßige Antwort auf die Erniedrigung der Glucosekonzentration erkennen. Im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrolltier, bei dem über 5 Stunden Glucose und ILA-Konzentration untersucht wurden, wurden bei den mit Glycodiazin behandelten Tieren im gleichen Zeitraum erhebliche Schwankungen gefunden. Gegenüber den ILA-Ausgangswerten wurde 10 Minuten nach i.v. Applikation von 100 mg/kg in 2 Fällen eine Steigerung bereits von 100 % gefunden, bei 50 mg/kg i.v. in 1 Fall eine Steigerung um 100 % nach 15 Minuten, während mit gleicher Dosis in einem weiteren Fall nur geringe Zunahme zu finden war. Bei einer Dosis von 200 mg/kg i.v. sahen wir sogar einen Abfall der ILA gegenüber dem Ausgangswert. Bei der p.o. Gabe sahen wir einen raschen Anstieg der ILA bei einer Dosis von 200 mg/kg, bei einer Dosis von 100 mg/kg einen Anstieg nach 90 - 180 Minuten pa.. Eine Korrelation dieser Werte zum hypoglykämischen Effekt ist nicht möglich.

Vor allem bei den Untersuchungen an den Hunden wurden starke

Unterschiede der insulin-like-activity festgestellt. Die Ursache hierfür könnte sein, daß mit der verwandten Methode nicht Insulin, sondern nur eine insulinartige Wirkung gemessen wird. Es gibt eine sog. suppressible und unsuppressible insulin-like-activity, d.h. ein Teil der ILA kann durch Antikörper unterdrückt werden. Die Zunahme der ILA kann nur das echte Insulin betreffen, welches normalerweise nur 10 % der Gesamt-ILA ausmacht; der Rest ist chemisch sicher nicht mit Insulin identisch. Es ist deshalb möglich, daß nach geringen Insulin-Ausschüttungen es wohl zu einer biologischen Wirkung kommt, ein Unterschied nach Redul jedoch nicht gesehen wird, da eine Zunahme der ILA um 10 - 15 % bei der Streuung der von mir verwandten Methode nicht meßbar ist.

V. Zusammenfassung

1. Untersucht wurde der Einfluß von oraler und intravenöser Verabreichung von 2-Benzolsulfonamido-5(beta-methoxy-äthoxy)-pyrimidin auf die ILA im Serum von Ratte und Hund.
2. Angewandt wurde die Rattenfettgewebismethode nach MARTIN und RENOLD. Diese wurde so modifiziert, daß sich ihre Vertrauensgrenze und Reproduzierbarkeit erhöhten.
3. Nach oraler Verabreichung von 100 mg/kg Glycodiazin an der Ratte zeigte die Glucosekonzentration des Serums nach 45 - 60 Minuten p.a. das Maximum der Hypoglykämie und gegenüber den Ausgangswerten eine Senkung um 36,4 %.
Die ILA steigt nach 45 Minuten durchschnittlich um 38,2 % an.
4. Nach oraler und/oder i.v. Verabreichung von 50, 100 und 200 mg/kg wird der Blutzucker beim Hund um durchschnittlich 55,2 % gesenkt.
Die ILA läßt keine Gesetzmäßigkeiten erkennen. Gegenüber dem Kontrolltier traten erhebliche Schwankungen auf, die jedoch keinen Schluß als Antwort auf die Insulinausschüttung zulassen.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Antoniades, H.N.; Gunderson, K.: "Studies on the State of Insulin in blood". Dissociation of purified human blood Insulin complex(es) by incubation with adipose tissue extracts in vitro.
Endocrinology 68 (1961), 36-42
- 2 Antoniades, H.N.; Bougas, J.A.; Pyle, H.M.: "Studies on the State of Insulin in blood". Examination of Splenic, Portal and Peripheral Blood Serum of Diabetic and Nondiabetic Subjects for free Insulin and Insulin Complexes.
The New England Journal of medicine 267, Aug. 1962
- 3 Antoniades, H.N.; Gunderson, K.; Pyle, H.M.: "Studies on the State of Insulin in blood". The role of Glucose in the vivo dissociation of Insulin complexes.
Endocrinology 69 (1961), 163-169
- 4 Boehringer-Mannheim: Enzymatische Bestimmung der "wahren Glucose".
- 5 Bornstein, J.: A technique for the assay of small quantities of insulin with alloxan diabetic, hypophysectomized and adrenalectomized rats.
Aust. J. exp. Biol. med. Scie. 28 (1950), 87
- 6 Creutzfeldt, W.: Zur Theorie des Diabetes mellitus.
Med.Klin. 2 (1958)
- 7 Ditschuneit, H.; Faulhaber, J.D.; Pfeiffer, E.F.: Verbesserungen der Methode zur Bestimmung von Insulin im

Blut mit Hilfe radioaktiver $1-^{14}\text{C}$ -Glucose und dem epididymalen Rattenfettgewebe.

Nowakowski, H.: Gewebs- und Neurohormone, Springer-Verlag 1962, S. 387

- 8 Ditschuneit, H.; Chan-Su-Ahn; Pfeiffer, M.; Pfeiffer, E.F.:
Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose; Veröffentlichung I.
Klin. Wo. 37 (1959)
- 9 Ditschuneit, H.; Pfeiffer, E.F.; Rossenbeck, H.G.: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose; Veröffentlichung III.
Klin. Wo. 39 (1961)
- 10 Ditschuneit, H.; Pfeiffer, E.F.; Ziegler, R.: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose; Veröffentlichung IV.
Klin. Wo. 39 (1961)
- 11 Daweke: Bestimmung der Insulinaktivität im menschlichen Serum nach Glucosebelastung als Prüfung der Funktionsfähigkeit des Pankreas.
Acta End. 42 (1963), 437-452
- 12 McGavack, T.H.: A Critical Appraisal of oral hypoglycemic agents.
J. Am. Geriatrics Soc. 7 (1959), 681-697
- 13 Grodsky, G.M. and Peng, C.T.: Extractable Insulin Measured by Immuno-Chemical Assay; Effect of Tolbutamide.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101 (1959), 100-103

- 14 Gutsche,K.: Sulfonamidopyrimidine, eine neue Gruppe blutzuckersenkender Verbindungen.
Arzn.Forsch. 14 (1964), 373-412
- 15 Kramer,M.: Pharmakologie des 2-Benzolsulfonamido-5(beta-methoxy-äthoxy)-pyrimidin (Glycodiazin), einer neuen blutzuckersenkenden Verbindung.
Arzn.Forsch. 14 (1964), 373-412
- 16 Nakamura,K.; Izumi,K.; Shigeta,Y.; Wada,M.: Serum-insulin-like-activity and the effect of oral antidiabetic drugs with special reference to failure in long-term use.
Endocrinol.Japon. 10/2 (1963), 93-101
- 17 Renold,A.E.; Martin,D.B.; Dagenais,Y.M.: An assay for insulin-like-activity using rat adipose tissue.
Lancet II (1958), 76
- 18 Renold,A.E.; Martin,D.B.; Dagenais,Y.M.; Steinke,J.; Nickerson,R.J.; Sheps,M.C.: Measurement of small quantities of insulin-like-activity using rat adipose tissue.
I A proposed procedure.
J.clin.Invest. 39/2 (1960), 1487-1498
- 19 Renold,A.E.; Martin,D.B.; Dagenais,Y.M.; Steinke,J.; Nickerson,R.J.; Sheps,M.C.: Measurement of small quantities of insulin-like-activity using rat adipose tissue.
II Evaluation of performance.
J.clin.Invest. 39 (1960), 1444-1510
- 20 Samaan,N.; Russel Fraser and Dempster,W.J.: The "Typical" and "Atypical" Forms of Serum Insulin.
Diabetes 12/4 (1963), 339-348

- 21 Vallance-Owen, J.; Hurlock, B.: Estimation of plasma insulin
by the Rat Diaphragm Method.
Lancet 1 (1954), 68
- 22 Yalow, R.S.; Berson, S.A.: Plasma Insulin Concentrations in
Nondiabetic and Early Diabetic Subjects. Determina-
tion by a New Sensitive Immuno-assay Technic.
Diabetes 9 (1960), 254-260
- 23 Yalow, R.S.; Berson, S.A.: Immunologic Aspects of Insulin.
Am.J.Med. 31/6 (1961), 882-891
- 24 Yalow, R.S. and Berson S.A.: Assay of plasma insulin in
human subjects by immunologic methods.
Nature 184, 1648

Herrn Professor Dr.med. M. K r a m e r
schulde ich besonderen Dank für das Thema und die
Betreuung meiner Inauguraldissertation; Dank schulde
ich der Schering AG, Berlin für die großzügige Be-
reitstellung ihrer Laboratorien. Herrn Dr. K.H.
K o l b bin ich für den unermüdlichen Rat bei der
Durchführung der experimentellen Untersuchungen und
der Durchsicht der Korrekturen zu größtem Dank ver-
pflichtet.

Am 28. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Frauenarztes Dr.med. Richard Petzold und seiner Ehefrau, Dr.cult. Ursula Petzold geb. Schaffrath, zu Dresden geboren. In Dresden trat ich 1946 in die Volksschule ein und setzte von 1954 an meine Schulausbildung an der Kreuzschule zu Dresden fort. Hier bestand ich im Juli 1958 die Reifeprüfung. Nach meiner Umsiedelung in die Bundesrepublik Deutschland legte ich 1960 in Delmenhorst bei Bremen die Anerkennungsprüfung für mein in Dresden bestandenes Abitur ab. Im Sommersemester 1960 studierte ich an der Technischen Universität Berlin Physik. Im Wintersemester 1960/61 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, legte hier 1961 die Prüfung des Vorphysikums und 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Oktober 1966 bestand ich an der Freien Universität Berlin die ärztliche Prüfung.

